

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

14.02.00

## 日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 31 MARS 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 1月 8日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第002807号

出願人

Applicant(s):

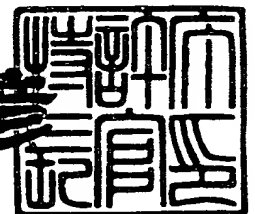
住友化学工業株式会社

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月17日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3016119

【書類名】 特許願

【整理番号】 P149745

【提出日】 平成11年 1月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09

【発明の名称】 化学物質のA h レセプター活性化能の測定用細胞

【請求項の数】 1

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友化学工業株式会社内

    【氏名】 松永 治之

【発明者】

    【住所又は居所】 大阪市此花区春日出中3丁目1番98号 住友化学工業株式会社内

    【氏名】 大江 師久

【特許出願人】

    【識別番号】 000002093

    【氏名又は名称】 住友化学工業株式会社

    【代表者】 香西 昭夫

【代理人】

    【識別番号】 100093285

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 久保山 隆

    【電話番号】 06-6220-3404

【選任した代理人】

    【識別番号】 100094477

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 神野 直美

    【電話番号】 06-6220-3404

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010238

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9701007

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 化学物質の Ah レセプター活性化能の測定用細胞

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

レポーター遺伝子の発現量を指標に化学物質のアリルハイドロカーボンレセプター活性化能を測定するための細胞であって、(1)アリルハイドロカーボンレセプター遺伝子および Arnt 遺伝子を発現し、(2)染色体に (a) ダイオキシン応答配列および転写開始に必要な塩基配列の下流に接続されてなるレポーター遺伝子、ならびに、(b) 前記レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードし、ダイオキシン様物質の接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子が導入されてなる細胞。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、化学物質のアリルハイドロカーボンレセプター活性化能の測定用細胞に関する。

【0002】

【従来の技術】

一般に、ポリ塩化ジベンゾ-p-ジオキシン (PCDD) およびポリ塩化ジベンゾフラン (PCDF) がダイオキシン類と総称され、これらにコプラナポリ塩化ビフェニル (PCB) を加えた 3 種の化合物群がダイオキシン様物質と総称されている。これらのダイオキシン様物質にはいずれも置換塩素の数や位置によって数多くの構造異性体および同族体が存在するが、その一部は極めて微量でも生体内において生殖異常、免疫異常、発癌などを惹起することから、住環境や食品等の安全性評価の一環として、毒性を示すダイオキシン様物質を測定する試みがなされている。

ダイオキシン様物質は、細胞内でアリルハイドロカーボンレセプター (Mol. Pharmacol., 39, 13-19 (1991); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8185-8189 (1992)). 以下

、Ahレセプターと記す。)に結合することによってその毒性を惹起する[Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.,22,517-554(1982)、Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.,26,371-399(1986)等]。2,3,7,8-TCDD等のダイオキシン様物質がAhレセプターに結合すると、該レセプターは活性化されて核内に移行した後、Arnt[Ah receptor nuclear translocator。Science,252,954-958(1991)。]と呼ばれる核タンパク質とヘテロ二量体を形成し、該二量体が染色体上のダイオキシン応答配列[Dioxin responsive element (DRE) ; Xenobiotic responsive element (XRE) と呼ばれることもある。J.Biol.Chem.,263,17221-17224(1988)]に結合することにより、該配列の下流にある遺伝子の転写を活性化する。

そこで、該ダイオキシン応答配列の下流にAhレセプター活性化能の指標となるレポーター遺伝子を結合させ、これを細胞に導入し、該細胞に被験物質を接触させ培養した際の該レポーター遺伝子の発現量を指標にすることにより、被験物質のAhレセプター活性化能を測定する方法が提案されている(Fund.Appl.Toxicol.,30,194-203(1996)など)。このような方法により、種々の化学物質のAhレセプター活性化能を測定することにより、ダイオキシン様の毒性を惹起し得る化学物質の検出が可能となる。

#### 【0003】

##### 【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、このような方法においては、操作のばらつきや、被験物質の細胞に対する影響等による細胞数の変化が生じ易いことから、試験毎に測定誤差が生じ易く、また、精度の高い測定値を得る為には、試験毎に細胞数を数えたりする等して、実測値を補正する必要があり、操作が極めて煩雑であった。そこで、化学物質のAhレセプター活性化能の、より簡便な測定方法が切望されていた。

#### 【0004】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明者らは、かかる状況の下、鋭意検討した結果、被験物質のAhレセプター活性化能の指標となるレポーター遺伝子と、細胞数の指標となるレポーター遺伝子とを染色体上に有する細胞を作出することに成功し、本発明に至った。

即ち、本発明は、レポーター遺伝子の発現量を指標に化学物質のAhレセプター

活性化能を測定するための細胞であって、

(1) Ahレセプター遺伝子およびArnt遺伝子を発現し、

(2) 染色体に

(a) ダイオキシン応答配列および転写開始に必要な塩基配列の下流に接続されてなるレポーター遺伝子、

ならびに、

(b) 前記レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードし、ダイオキシン様物質の接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子

が導入されてなる

細胞（以下、本発明細胞と記す。）を提供するものである。

【0005】

#### 【発明の実施の形態】

以下、さらに詳細に本発明を説明する。

本発明細胞を調製するに際し、用いることのできる宿主細胞は、Ahレセプター遺伝子およびArnt遺伝子を発現する細胞であって、例えば哺乳動物細胞、昆虫細胞、酵母細胞等の真核生物細胞があげられ、操作性や再現性を考慮すると安定に継代可能な細胞が好ましい。具体的には、マウス由来Hepalclc7細胞 [American Type Culture Collection (ATCC) から入手可能]、ラット由来H4IIE細胞 (ATCCから入手可能)、ヒト由来HepG2細胞 (ATCCから入手可能) などのAhレセプター内在性の細胞があげられる。また、酵母細胞、CV-1細胞等のAhレセプター非内在性細胞またはAhレセプター遺伝子の発現量の少ない細胞は、該細胞に予めAhレセプター遺伝子を導入し該遺伝子の発現能を付与することにより使用することができる。このような宿主細胞に導入されるAhレセプター遺伝子としては、ヒト [GenBank Accession No.L19872、Mol.Pharmacol.44,911-917(1993)]、マウス [GenBank Accession No.M94623、Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89,8185-8189(1992)]、またはラット [GenBank Accession No.M94623、Nucleic Acids Res.,22,3038-3044(1994)] 等に由来する cDNA 遺伝子があげられ、これらの遺伝子はその翻訳開始コドン ATG の上流に Kozak のコンセンサス配列 (Nucleic Acids Res., 12, 857-872 (1984



)) が連結されていてもよい。また、かかるAhレセプター遺伝子を宿主細胞で発現させるには、該遺伝子を、宿主細胞において発現するようにプロモーターと結合された形でベクターに挿入し、宿主細胞に導入するとよい。このようなプロモーターとしては、ラウス肉腫ウイルス (RSV) プロモーター、サイトメガロウイルス (CMV) プロモーター、シミアンウイルス (SV40) の初期もしくは後期プロモーター、またはマウス乳頭腫ウイルス (MMTV) プロモーター等があげられ、ベクターとしては大腸菌中での複製起点および薬剤耐性マーカー遺伝子を有するプラスミド等があげられ、上記のようなプロモーターを有しその下流に遺伝子挿入部位を有する市販の発現用ベクターを利用することもできる。

#### 【0006】

被験物質のAhレセプター活性化能の指標とするレポーター（以下、活性化能レポーターと記す。）遺伝子としては、その転写産物の有する酵素活性等に基づき発現量の測定が容易な遺伝子が好ましく、例えば、ホタルルシフェラーゼ、ウミシイタケルシフェラーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、アルカリホスファターゼなどをコードする遺伝子があげられる。

前記の活性化能レポーター遺伝子は、宿主細胞においてダイオキシン応答配列の転写制御下に発現させる。ダイオキシン応答配列としては、チトクロムP450A1遺伝子[cyp1A1, J. Biol. Chem., 263, 17221-17224 (1988), Nucleic Acids Res., 15, 4179-4191 (1987)]、グルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3826-3830 (1990)]、UDP-グルクロニルトランスフェラーゼ遺伝子[J. Biol. Chem., 271, 3952-3958 (1996)]などの哺乳動物由来の遺伝子の5'上流領域をPCRなどを用いて増幅しクローニングすることにより得られるDNA断片を用いることができる。また、ダイオキシン応答配列のコンセンサス配列[コア配列: 5'-(T/A)GCGTG, J. Biol. Chem., 271, 3952-3958 (1996)]を1以上有する塩基配列からなるDNA断片を化学合成して用いてもよい。尚、十分な転写制御能を得るには、前記のダイオキシン応答配列のコンセンサス配列は通常2~5程度タンデムに連結されていることが好ましい。

宿主細胞において、活性化能レポーター遺伝子を前記のようなダイオキシン応

答配列の転写制御下に発現させるためには、ダイオキシン応答配列と活性化能レポーター遺伝子との間に、転写開始に必要な配列すなわちプロモーター配列があることが必要である。ここで、転写開始に必要な配列としては、TATAボックスおよび転写開始のリーダー配列を有する必要最小限の塩基配列があげられ、さらに転写因子Sp1の結合するGC豊富な領域（BTE配列）をTATAボックスの5'上流に有することが好ましい。例えば、チミジンキナーゼ遺伝子（tk）やグルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子の5'上流領域（転写開始点を1として、-164番目の塩基～+66番目の塩基周辺、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3826-3830 (1990))等があげられる。

## 【0007】

試験時の細胞数の指標とするレポーター（以下、細胞数レポーターと記す。）遺伝子としては、その転写産物の有する酵素活性等により発現量の測定が容易な遺伝子が好ましく、前記の活性化能レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードする別のレポーター遺伝子を用いる。該レポーター遺伝子は、ダイオキシン様物質の接触により転写活性が変化しないプロモーター、すなわち、上記のダイオキシン応答配列の制御を受けず構成的な転写能を有するプロモーターと連結された形となるように宿主細胞に導入される。このようなプロモーターとしては、例えば、tkプロモーター、RSVプロモーター、CMVプロモーター等があげられる。

## 【0008】

本発明細胞を調製するには、例えば、（a）ダイオキシン応答配列および転写開始に必要な塩基配列の下流に接続されてなる活性化能レポーター遺伝子と、（b）前記レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードし、ダイオキシン様物質の接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなる細胞数レポーター遺伝子とを、それぞれプラスミド等のベクターに組込んで宿主細胞に導入するとよい。具体的には例えば、ダイオキシン応答配列を含むCYP 1 A1遺伝子の5'上流領域およびTATA-BTEプロモーターの下流にホタルルシフェラーゼ遺伝子（活性化能レポーター遺伝子）が組み込まれたプラスミド、および、tkプロモーターの下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子

(細胞数レポーター遺伝子)が組込まれたプラスミドを作製し、これらをAhレセプター内在性のHepalclc7細胞に導入する。ここで、それぞれのプラスミドには通常、異なる薬剤耐性マーカー遺伝子が組み込まれ、そのような薬剤耐性マーカー遺伝子としては、ネオマイシン耐性(アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ)遺伝子、ブラストサイジンS耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子などがあげられる。

## 【0009】

上記のようなレポーター遺伝子の組込まれたプラスミドを宿主細胞に導入するには、例えば、Hepalclc7細胞等の宿主細胞をシャーレに播き( $10^5 \sim 10^7$ 細胞/直径6~10cmシャーレ)、5~10%程度の血清を含有する $\alpha$ MEM培地等を用いて、5%CO<sub>2</sub>および飽和湿度条件下に37℃で数時間~一晩程度培養する。このようにして培養した細胞へ、レポーター遺伝子の組込まれたプラスミドDNAを導入する。DNA導入法としては、一般的なりポフェクション法、DEAE-デキストラン法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法などをあげることができる。具体的には例えば、市販のりポフェクチンを用いる場合には、添付のマニュアルに従って操作を行ない、導入するDNA(プラスミド)の量比、りポフェクチンの量、細胞の種類、細胞の数などは、予備検討を行い最適条件を求めておくといよい。薬剤耐性マーカー遺伝子を含むプラスミドをレポータープラスミドとは別に導入する場合には、その量比をレポータープラスミドの1/5~1/10程度にすると良い場合もある。これら複数種のDNA(プラスミド)は同時に宿主細胞へ導入することが可能である。プラスミドDNAとしては、CsCl密度勾配遠心法で精製したDNAまたはそれと同等の純度のDNAを用い、必要な領域(ダイオキシシン応答配列、プロモーター、レポーター遺伝子、および薬剤耐性マーカー遺伝子)に認識部位の存在しない制限酵素であらかじめ切断して直鎖化したプラスミドDNAを用いてもよい。環状プラスミドまたは直鎖化したプラスミドDNAを細胞に導入した後、血清含有培地に交換し、1晩~2日程度培養を続ける。次に、細胞を常法(トリプシン処理等)に従って剥がし播き直す。直ちに、あるいは1~2日培養後、宿主細胞へ導入された薬剤耐性マーカー遺伝子に対応する選択用薬剤を培地に加え、非形質転換細胞が死滅して形質転換細胞に由来するコロニーが適当な大きさになるまで選

択用薬剤中で培養を続ける。この間、必要に応じて培地交換を1~2回/週の割合で行う。

このようにして得られたコロニーを複数に分割して植え直し、細胞を増殖させてから、その一部に適当なダイオキシン様物質の溶媒溶液を添加して1晩~2日間程度培養した後、活性化能レポーター遺伝子および細胞数レポーター遺伝子の発現量を測定する。また、対照として溶媒のみを添加した場合の活性を測定する。レポーター遺伝子の発現量の測定法は用いる個々のレポーター遺伝子の種類にもよるが、一般的には細胞溶解剤で細胞膜を破壊して細胞抽出液を調製し、該抽出液に含まれるレポーター、通常は酵素タンパクの酵素活性を、該酵素に特異的な基質を用いて、発光量、蛍光吸光度、吸光度などにより測定する。

次いで、ダイオキシン様物質との接触による活性化能レポーター遺伝子の発現量の増大率が、溶媒のみを添加した系（対照区）における発現量の増大率に対して少なくとも2倍以上、好ましくは10倍以上であった細胞を選択する。また、本発明細胞においては、細胞数レポーターの発現量がダイオキシン様物質の接触により変化しないことが好ましいことから、細胞数レポーター遺伝子の発現量の増大率が、活性化能レポーター遺伝子の発現量の増大率の半分以下である細胞を選択するとよい。尚、このようにして得られたコロニーが単一の形質転換細胞で構成されていない場合は、該細胞を希釈培養し、単一の細胞からなるコロニーを選択する。

#### 【0010】

以上のようにして得られる本発明細胞を用いたAhレセプター活性化能の測定方法の例を以下に述べる。

本発明細胞を96ウェルプレートに1ウェルあたり $10^3 \sim 10^4$ 程度植え、5~10%となるよう血清を含有する培地（ $\alpha$  MEM等）を100~200  $\mu$  L添加し、5%  $CO_2$ および飽和湿度条件下に37℃で数時間~1晩程度培養する。次に、被験試料（化合物等）の溶媒溶液または溶媒のみを最終体積濃度が0.5~2%以下になるように添加する。溶媒にはジメチルスルフォキシド（DMSO）、エタノール等が用いられる。被験試料が水溶液である場合には、ポアサイズ20  $\mu$  mのフィルターで濾過滅菌した後、終濃度10%以下になるように上記培養系に添加する。被験試料を添加した後、1

晩～2日間程度培養を続け、上述した方法により活性化能レポーターおよび細胞数レポーターの活性を測定する。

#### 【0011】

本発明細胞を用いることにより、活性化能レポーター活性と共に細胞数レポーター活性が、同じ細胞抽出液を用いて測定できることから、試験操作のばらつきや、被験物質の細胞に対する影響等による細胞数の変化を煩雑な操作を要することなく把握でき、よって、適切な測定値を選出できると共に、実測値を容易に補正することもでき、従って、化学物質のAhレセプター活性化能を簡便に、且つ、より精度よく測定することが可能となる。また、本発明細胞は凍結保存が可能であり必要に応じて起眠して使用することできることから、本発明細胞を試験に用いることにより、レポーター遺伝子を宿主細胞に一過性に導入した細胞を用いる場合に試験毎に要する遺伝子導入と細胞選抜の操作を省くことができ、また、一定の性能の細胞を使用して再現性よく測定することが可能となる。

#### 【0012】

##### 【実施例】

以下に、実施例および試験例により、本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 【0013】

##### 実施例1 レポータープラスミドの構築

ラットのゲノムDNAをテンプレートとし、オリゴヌクレオチド5'-gcgctagcatggtagcgccttgctcagcc-3' および5'-gcaagcttgagtactgacctagcgagag-3'をプライマーとしてPCRを行なうことにより、ラットのグルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子の5'上流領域由来のTATA含有プロモーター領域（転写開始点を1として、-164番目から+53番目までの塩基からなる領域）（Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3826-3830 (1990)）を含むDNA断片を増幅しこれをクローニングした。このようにして得られた前記DNA断片を、ホタルルシフェラーゼレポータープラスミドpGV-P（東洋インキ社販売）のHindIII-NheI部位間に挿入してプラスミドpGV-Yaを得た。次いで、ラットグルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子の5'上流領域に存在するダイオキシシン応答配列（Pr

oc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3826~3830 (1990)) を含む塩基配列からなるオリゴヌクレオチド、5'-ctcaggcatgttgctgcatccctgaggccagccgagct-3' (A) および 5'-cggctggcctcagggatgcacgcaacatgcctgagagct-3' (B) を合成し、該オリゴヌクレオチド A と B とをアニーリングして 2 本鎖 DNA とした後、ライゲーション反応を行って該 2 本鎖 DNA が 5 つタンデムに連結されてなる DNA 断片、XREx5 を得た。該 XREx5 断片を前述した pGV-Ya の SacI 切断部位に挿入して、ダイオキシン応答配列および転写開始に必要な塩基配列の下流に活性化能レポーター遺伝子が接続されてなるプラスミド pGV-Ya-XREx5 (図 1) を得た。

【0014】

## 実施例 2 本発明細胞の作製

Hepalcl7 細胞 (ATCC から入手) を  $5 \times 10^5$  細胞ずつ 2 枚の直径 10cm シャーレに播き、 $\alpha$  MEM 培地 (牛胎仔血清を 10% 含有) 中、37℃、5%  $\text{CO}_2$  存在下に一晚培養した (以下、培養は常に 37℃、5%  $\text{CO}_2$  存在下で実施した)。実施例 1 で構築された活性化能レポータープラスミド pGV-Ya-XREx5 を BamHI で消化し、細胞数レポーター遺伝子として用いるウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子を含有するプラスミド pRL-TK (東洋インキ社販売) を BamHI で消化し、およびネオマイシン耐性 (アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ) 遺伝子含有プラスミド pRc/RSV (INVITROGEN 社製) を HindIII で消化してそれぞれ直鎖化し、リポフェクション法で上記の Hepalcl7 細胞に導入した。すなわち、リポフェクション (GIBCO-BRL 社製) の添付マニュアルの記載に従い、BamHI 消化 pGV-Ya-XREx5 2.8  $\mu$ g、BamHI 消化 pRL-TK 2.8  $\mu$ g、HindIII 消化 pRc/RSV 0.5  $\mu$ g、およびリポフェクション 36  $\mu$ l を無血清  $\alpha$  MEM 培地中で混合し、一晚保温した後、無血清  $\alpha$  MEM 培地で 1 回洗浄した Hepalcl7 細胞に添加した後、5 時間培養した (トランスフェクション)。次に、培地を 10% 血清含有  $\alpha$  MEM 培地に交換し、一晚培養した。続いて、細胞を剥がし、10% 血清含有  $\alpha$  MEM 培地に懸濁して 100ml とし、96 ウェルプレートに 100  $\mu$ l / ウェルの割合で播種した。一晚培養した後、geneticin (G418) を 1.6 mg/ml の濃度となるよう 10% 血清含有  $\alpha$  MEM 培地に溶解させた培地を 100  $\mu$ l / ウェルの割合で添加した (G418 終濃度 800  $\mu$ g/ml)。培養を続け、800  $\mu$ g/ml の G418 を含む、新しい 10% 血清含有  $\alpha$  MEM 培地に 1 回 / 週の割合で交換した。培地の容量は 200  $\mu$ l /

ウェルとした。培養3週間後にコロニーがみつめられたウェルから細胞を剥がして回収し（192ウェル分）、該細胞を3分割して別々のプレートに播種し培養を4日間続けた。次に、1番目のプレートにはDMSOのみ（溶媒対照）、2番目のプレートには3-メチルコラントレン（3-MC）を終濃度 $10\mu\text{M}$ となるように加え、一晚培養を続けた。また、3番目のプレートはマスタープレートとして何も添加せずにそのまま培養を続けた。DMSOまたは3-MCを添加したプレートの各ウェルから培地を除き、PBS(-)で2回ウェルを洗浄後、細胞溶解液を $15\mu\text{l}$ /ウェル加えて細胞を溶解し、細胞抽出液を得た。この細胞抽出液 $10\mu\text{l}$ をピッカジーンデュアル（ルシフェラーゼアッセイ）基質（東洋インキ社販売）と混合し、ルミノメーターで発光量を測定した。3-MC添加によるホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子（活性化能レポーター遺伝子）の発現量の増大率の高い方から5クローンを選び、マスタープレートから再度細胞を分割播種した。該細胞を用いて同様にルシフェラーゼアッセイを行い、ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現量が3-MC添加によって2倍以上増大した4クローンを選んだ。さらに、このようにして選ばれた4クローンについて、前記同様の細胞播種およびルシフェラーゼアッセイを行い、ホタルルシフェラーゼレポーター遺伝子の発現量が3-MC添加によって約10倍増大したクローンを選んだ。

## 【0015】

## 試験例 1

実施例 2 において選抜したクローンを96ウェルプレートに40,000細胞/ウェルの割合で播き、一晚培養した。2,3,7,8-テトラクロロジベンゾ-p-ジオキシン $50\mu\text{g/ml}$ ノナン溶液（関東化学社製）をDMSOで希釈し、培地中の終濃度が0.4%（v/v）となるように上記細胞に添加した。培養を続け、約40時間後に培地を除き、PBS(-)で2回細胞を洗浄した後、細胞溶解液を $20\mu\text{l}$ /ウェル加え、室温で細胞を溶解し細胞抽出液を得た。この細胞抽出液 $10\mu\text{l}$ をピッカジーンデュアル（ルシフェラーゼアッセイ）基質（東洋インキ社販売）と混合し、ルミノメーターで発光量を測定した。

【表 1】

| TCDD 終濃度<br>(pg/ml) | ホタルシフェラーゼ 発光量<br>( $\times 10^4$ )<br>(pGV-Ya-XREx5 由来) | ウシイタリシフェラーゼ 発光量<br>( $\times 10^6$ )<br>(pRL-TK 由来) |
|---------------------|---|---|
| 0                   | 0.486   | 1.17  |
| 0.02                | 0.517   | 1.15  |
| 0.2                 | 0.532   | 1.10  |
| 2                   | 0.873   | 1.08  |
| 20                  | 3.14  | 0.894   |
| 200                 | 4.46  | 0.783   |
| 2000                | 4.17  | 0.691   |
| 20000               | 4.49  | 0.728   |

【0016】

## 【発明の効果】

本発明細胞を用いることにより、簡便に、且つ、より精度よく化学物質のAhレセプター活性化能の測定が可能となる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

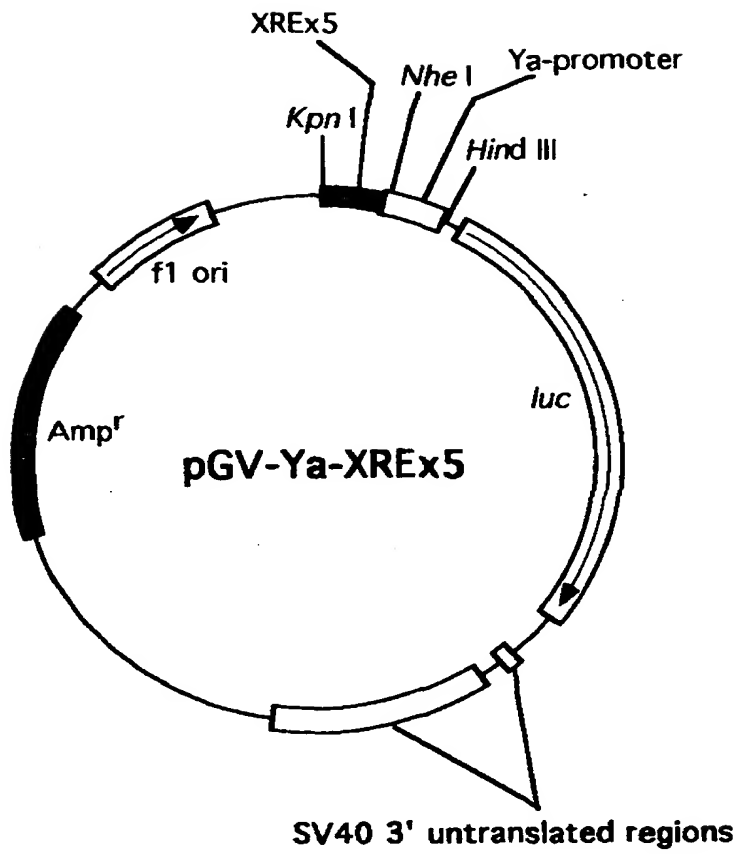
ダイオキシン応答配列および転写開始に必要な塩基配列の下流に接続されてなるレポーター遺伝子を含むプラスミドpGV-Ya-XREx5の構造を示す図である。lucはホタルシフェラーゼ遺伝子を、Amp<sup>r</sup>はアンピシリン耐性遺伝子を、XREx5は、ラットグルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子の5'上流領域に存在するダイオキシン応答配列がタンデムに5つ連結されてなる塩基配列を、Ya-promoterは、ラットのグルタチオンS-トランスフェラーゼYaサブユニット遺伝子の5'上流領域由来のTATA含有プロモーター領域（転写開始点を1として、-164番目から+53番目までの塩基からなる領域）をそれぞれ表す。



【書類名】

図面

【図 1】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

化学物質のアリルハイドロカーボンレセプター活性化能のより簡便な測定方法を提供すること。

【解決手段】

レポーター遺伝子の発現量を指標に化学物質のアリルハイドロカーボンレセプター活性化能を測定するための細胞であって、（１）アリルハイドロカーボンレセプター遺伝子およびArnt遺伝子を発現し、（２）染色体に（a）ダイオキシン応答配列および転写開始に必要な塩基配列の下流に接続されてなるレポーター遺伝子、ならびに、（b）前記レポーター遺伝子のコードするタンパク質と判別可能なタンパク質をコードし、ダイオキシン様物質の接触により転写活性が変化しないプロモーターの下流に接続されてなるレポーター遺伝子が導入されてなる細胞。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000002093]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住 所 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号

氏 名 住友化学工業株式会社

THIS PAGE BLANK (USPTO)